

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 238—241, Mai 1971

Eine Methode zur Bestimmung des freien Ätiocholanolons im Plasma

Von V. GRAEF

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Eingegangen am 4. Dezember 1970)

Eine Methode zur Bestimmung des freien Ätiocholanolons im Plasma wird beschrieben. Durch Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxid wird das Ätiocholanolon aus dem Plasmaextrakt isoliert. Nach Acetylieren der 3-Hydroxygruppe und Reaktion der 17-Oxogruppe mit Dansylhydrazin wird das Acetyl-ätiocholanolon-dansylhydrazon durch eine 2. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel abgetrennt. Die Fluoreszenz dieses Derivates wird gemessen. Mit dieser Methode können noch 0,006 µg Ätiocholanolon bestimmt werden.

A method for the determination of free aetiocholanolone in plasma

A method for the determination of free aetiocholanolone in plasma is described. The aetiocholanolone is isolated by thin layer chromatography on aluminium oxide. After acetylation of the 3-hydroxy-group and reaction of the 17-oxo-group with dansylhydrazine the acetyl-aetiocholanolone-dansylhydrazone is separated by thin layer chromatography on silica gel. The fluorescence of this derivative is measured. As little as 0.006 µg aetiocholanolone can be determined by the above method.

Die Bestimmung des freien, unkonjugierten Ätiocholanolons im Plasma wird zur Diagnose des sog. Ätiocholanolonefiebers benutzt. Die pyrogene Wirkung des Ätiocholanolons wurde 1957 von SEGALOFF (1) und von KAPPAS (2) erkannt. Normalerweise kommt das freie Ätiocholanolon nur in sehr geringen Konzentrationen im Plasma vor. Die meisten Autoren fanden Werte unter 1 µg/100 ml. Während der periodisch auftretenden Fieberanfälle steigt der Gehalt des Plasmas an freiem Ätiocholanolon auf ein Mehrfaches der normalen Konzentration an. Das freie Ätiocholanolon wurde bisher mit einer Doppelisotopenverdünnungsmethode (3) und einer gaschromatographischen Methode (4) bestimmt. Wegen der geringen Konzentration läßt sich die ZIMMERMANNsche Farbreaktion auf 17-Oxosteroide nicht verwenden; auch mit der Mikro-ZIMMERMANN-Reaktion lagen die Werte unter der Nachweisgrenze der Methode (5). Durch Überführung des Ätiocholanolons in das gelbgefärbte 2,4-Dinitrophenylhydrazon wurde die photometrische Bestimmung kleinerer Mengen dieses Steroides möglich (6, 7).

Wie wir kürzlich berichteten (8), kann man Oxosteroide mit Dansylhydrazin in die stark fluoreszierenden Dansylhydrazone überführen. Diese Reaktion wurde nun zur Bestimmung des freien Ätiocholanolons im Plasma angewendet. Bei Verwendung von Mikroküvetten liegt die untere Nachweisgrenze bei 0,006 µg Ätiocholanolon in einer Probe.

Methodik

Reagenzien

Diäthyläther: DAB 6 (E. Merck, Darmstadt) wird stets frisch über Natriumdraht destilliert.

Methylenchlorid p. a. (E. Merck, Darmstadt), Essigsäureäthylester p. a. (E. Merck, Darmstadt) und Benzol p. a. (E. Merck, Darmstadt) werden mit je 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin und 1 g Trichloressigsäure/l destilliert. Um zu verhindern, daß Dinitro-

phenylhydrazin mitgerissen wird, setzt man eine kleine mit Raschig-Ringen gefüllte Kolonne auf den Destillationskolben auf. Chloroform: p. a. (E. Merck, Darmstadt).

n-Hexan: rein (E. Merck, Darmstadt).

Methanol: p. a. (E. Merck, Darmstadt) wird über Natriumborhydrid (2 g/l) destilliert und dann an einer Füllkörperkolonne redestilliert.

Aluminiumoxid: GF₂₅₄ für Dünnschichtchromatographie (E. Merck, Darmstadt).

Kieselgel H: für Dünnschichtchromatographie (E. Merck, Darmstadt).

Dünnschichtplatten: Glasplatten (20 × 20 cm) werden mit einer 0,25 mm dicken Schicht Aluminiumoxid GF₂₅₄ bzw. Kieselgel H versehen, 3 Std. im Trockenschrank bei 110° erhitzt und in einem Exsikkator ohne Trockenmittel aufbewahrt.

Ätiocholanolon (Vister, Casatenovo Brianza (Como)).

Progesteron (E. Merck, Darmstadt).

17α-Hydroxyprogesteron (E. Merck, Darmstadt).

1,1,2,2-Tetrachloräthan (E. Merck, Darmstadt).

Dansylhydrazin (1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylhydrazin): Die Darstellung erfolgt nach der in einer früheren Arbeit angegebenen Vorschrift (8).

Progesteron-bis-(dansylhydrazon)-Lösung: Man verdampft in einem spitzen Zentrifugenröhrchen 2 ml Progesteron-Lösung (1 mg/100 ml Chloroform), versetzt mit 1 ml Dansylhydrazin-Lösung (2,4 mg/25 ml Benzol) und 1 ml Trichloressigsäure-Lösung (30 mg/100 ml Benzol), dampft die Lösung nach 30 Min. am Rotationsverdampfer ein und trägt den Rückstand mit Essigester in Form mehrerer, dicht nebeneinander liegender Punkte auf eine Kieselgel-H-Platte auf, die im System Benzol/Essigester (80:20 v/v) entwickelt wird. Die unter der UV-Lampe fluoreszierende Zone wird ausgekratzt. Das Kieselgel eluiert man zweimal mit je 2,5 ml Chloroform. Die vereinigten Eluate werden eingedampft, den Rückstand löst man in 20 ml Benzol.

Alle Glasgeräte werden mit einer 5proz. Lösung von Lenex (Deutsche Shell-Chemie, Frankfurt/M.) gereinigt und gründlich mit warmem Leitungswasser und dest. Wasser gespült.

Extraktion des Plasmas

Blut wird unter Zusatz von Heparin (0,2 ml = 200 E/20 ml Blut) abgenommen und sofort zentrifugiert. 10 ml Plasma werden mit 3 ml 1N NaOH versetzt und einmal mit 50 ml und einmal mit 30 ml Methylenchlorid/Äther (1:4 v/v) extrahiert. Man schüttelt

die vereinigten Extrakte zweimal mit je 10 ml dest. Wasser aus. Dem 2. Waschwasser setzt man einen Tropfen Eisessig zu. Die Methylchlorid-Äther-Lösung wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und dann am Rotationsverdampfer eingedampft. Den Rückstand versetzt man mit 7 ml Methanol und 3 ml dest. Wasser, überführt die Lösung nach Abkühlen in einen Schütteltrichter und spült mit 5 ml 70proz. wäbr. Methanol nach. Die wäbr.-methanol. Lösung wird mit 5 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren saugt man die Hexanschicht ab und dampft die wäbr.-methanol. Lösung am Rotationsverdampfer bei 40° ein. Der Rückstand wird mit 4 ml Äthanol abgedampft und dann mit dreimal je 2 ml Chloroform in ein spitzen Zentrifugenröhrchen überführt. Diese Lösung dampft man dann ebenfalls ein.

1. Dünnschichtchromatographie

Man trägt den Verdampfungsrückstand des Plasmaextraktes mit dreimal 100 µl Chloroform auf eine Dünnschichtplatte (Aluminiumoxid GF₂₅₄) 2 cm vom unteren Rand entfernt auf. Daneben trägt man als Bezugssubstanz 3 µg 17α-Hydroxyprogesteron in 20 µl Chloroform auf und entwickelt die Platte dreimal im System Benzol/Methylchlorid/Essigester (74:32:16 v/v). Das 17α-Hydroxyprogesteron besitzt in diesem System den gleichen R_F -Wert wie Ätiocholanolon. Es ist im Gegensatz zum Ätiocholanolon bei Betrachtung der Platte unter der UV-Lampe sichtbar. Die Ätiocholanolon enthaltende Zone des Plasmaextraktes wird anhand des Referenzflecks unter der UV-Lampe markiert. Man kratzt das Aluminiumoxid aus und eluiert es in einem Zentrifugenröhrchen mit dreimal je 2,5 ml Chloroform. Nach Zentrifugieren (5 Min. bei 3000 U./Min.) pipettiert man den Überstand in ein spitzen Zentrifugenröhrchen, in dem es eingedampft wird. Es ist darauf zu achten, daß kein Aluminiumoxid mit überpipettiert wird.

Derivatbildung

Zu dem Verdampfungsrückstand des Eluates gibt man 0,4 ml Acetanhydrid und 0,1 ml Pyridin, mischt durch und läßt verschlossen über Nacht stehen. Ein weiteres Spitzröhrchen, das als Standard dient und 0,1 µg Ätiocholanolon enthält, wird mit den gleichen Mengen Acetanhydrid und Pyridin versetzt. Am nächsten Morgen pipettiert man in die Röhrchen je 1 ml Methanol und dampft nach 10 Min. am Rotationsverdampfer (Ölpumpe) ein. In den Röhrchen dampft man anschließend je 1 ml Progesteron-bis-(dansylhydrazon)-Lösung ein und versetzt sie dann mit je 100 µl Dansylhydrazin-Lösung (0,48 mg/10 ml Benzol) und 100 µl Trichloressigsäure-Lösung (1,5 mg/10 ml Benzol). In einem als Leerwert dienenden Spitzröhrchen verdampft man ebenfalls 1 ml Progesteron-bis-(dansylhydrazon)-Lösung sowie je 100 µl Dansylhydrazin- und Trichloressigsäure-Lösung. Nach 30 Min. werden die Lösungen am Rotationsverdampfer eingedampft.

2. Dünnschichtchromatographie

Man trägt den Verdampfungsrückstand in den Spitzröhrchen mit dreimal 100 µl Essigester punktförmig auf eine Kieselgel-H-Platte auf. Nach zweimaliger Entwicklung der Platten im System Benzol/Essigester (90:10 v/v) wird anhand des unter der UV-Lampe sichtbaren Flecks von Acetyl-ätiocholanolon-dansylhydrazon diese Zone von Hauptwert, Standard und Leerwert ausgekratzt. Das Kieselgel wird mit einer Glasperle und je 2,5 ml Chloroform versetzt und 5 Min. geschüttelt. Dann zentrifugiert man 5 Min. bei 3000 U./Min. und pipettiert das Eluat in Zentrifugenröhrchen, in denen es eingedampft wird. Das Kieselgel wird noch zweimal in der gleichen Weise eluiert, die Eluate dampft man in den gleichen Zentrifugenröhrchen ein.

Man löst den Rückstand in den Zentrifugenröhrchen in 1 ml Tetrachloräthan und mißt die Fluoreszenz in Quarzküvetten MF 4 (1 cm Schichtdicke, 1 ml Fassungsvermögen; Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) mit dem Zeiss-Spektrofluorometer. Anregung 362 nm, Fluoreszenz 511 nm; Spaltbreite 1,2/0,5 mm. Zur Berechnung wird die Fluoreszenz des Leerwertes von der des Hauptwertes und des Standards abgezogen.

Die Messung der Fluoreszenz ist auch in einem Photometer „Eppendorf“ mit Fluoreszenzzusatz möglich. Hierbei beträgt das Volumen der zu messenden Lösung 2,5 ml. Man verwendet das Primärfilter 313 + 366 nm und das Sekundärfilter 470—3000 nm.

Ergebnisse

Spezifität

Bei der 1. Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxid GF₂₅₄ wird Ätiocholanolon von den meisten Oxosteroiden getrennt, jedoch besitzt 17α-Hydroxyprogesteron den gleichen R_F -Wert (Tab. 1). Um das

Tab. 1
 R_F -Werte verschiedener Oxosteroide, Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxid GF₂₅₄, System Benzol/Methylchlorid/Essigsäureäthylester (74:32:16 v/v) nach dreimaliger Entwicklung

Steroid	R_F
Epitestosteron	0,41
Ätiocholanolon	0,49
17α-Hydroxyprogesteron	0,49
Testosteron	0,57
Dehydroepiandrosteron	0,66
Androsteron	0,70

Ätiocholanolon auch sicher zu erfassen, wurde eine 2 cm breite Zone der Dünnschichtplatte ausgekratzt. Dabei wäre es möglich, daß auch ein Teil des Testosterons mit eluiert wird. Da aber Testosteron-dansylhydrazon und Ätiocholanolon-dansylhydrazon bei der 2. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H in allen erprobten Lösungsmittelsystemen den gleichen R_F -Wert besaßen, würde man auch dieses Testosteron mitbestimmen. Wir fanden aber, daß sich die acetylierten Dansylhydrazone von Ätiocholanolon und Testosteron bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H trennen ließen (Tab. 2). Aus diesem Grunde

Tab. 2
 R_F -Werte von acetylierten Oxosteroid-dansylhydrazonen, Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H, System Benzol/Essigsäureäthylester (90:10 v/v) nach zweimaliger Entwicklung

Steroid	R_F
17α-Hydroxyprogesteron	0,08
Testosteron	0,41
Ätiocholanolon	0,50

wurde der Verdampfungsrückstand des Eluates der 1. Dünnschichtplatte vor der Umsetzung mit Dansylhydrazin acetyliert. Durch diesen zusätzlichen Arbeitsschritt ließ sich die Spezifität der Methode verbessern. Für die Spezifität der Methode spricht ferner die recht gute Übereinstimmung der von uns ermittelten Werte mit jenen, die mit einer Doppelisotopenverdünnungsmethode (3) und mit einer gaschromatographischen Methode (4) bestimmt wurden.

Richtigkeit

Bei unseren ersten Wiederfindungsversuchen eluierten wir das Aluminiumoxid der 1. Dünnschichtplatte mit Methanol. Der Verdampfungsrückstand des Eluates wurde acetyliert und dann mit Dansylhydrazin umgesetzt. Nach der 2. Dünnschichtchromatographie auf

Kieselgel H stellten wir fest, daß das Acetyl-ätiocholanolon-dansylhydrazon nicht auf die 2. Platte gelangt war, da es an beim Eluieren mit Methanol ins Eluat gelangtes Aluminiumoxid adsorbiert wird. Daraufhin führten wir die Elution mit Chloroform durch. Um zu verhindern, daß auch die mit Chloroform ins Eluat gelangenden geringen Mengen Aluminiumoxid das gebildete Acetyl-ätiocholanolon-dansylhydrazon adsorbieren, versetzten wir den Verdampfungsrückstand des Eluates vor der Umsetzung mit Dansylhydrazin mit Progesteron-bis-(dansylhydrazon), das an etwa vorhandenes Aluminiumoxid absorbiert wird. Das anschließend gebildete Acetyl-ätiocholanolon-dansylhydrazon wurde dann nicht mehr an das Aluminiumoxid gebunden. Das Progesteron-bis-(dansylhydrazon) stört die Bestimmung nicht, da diese Verbindung bei der 2. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H bedeutend langsamer läuft als Acetyl-ätiocholanolon-dansylhydrazon. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse einer

Tab. 3

Ergebnisse von Wiederfindungsversuchen ohne und mit Zusatz von Progesteron-bis-(dansylhydrazon). 10 ml Sammelplasma wurde jeweils 0,1 µg Ätiocholanolon zugesetzt

Wiedergefundenes Ätiocholanolon (µg) Ohne Progesteron-bis- (dansylhydrazon)	Wiedergefundenes Ätiocholanolon (µg) Mit Progesteron-bis- (dansylhydrazon)
0,033	0,056
0,036	0,068
0,038	0,079
0,050	0,086
0,053	0,086
0,057	0,086
0,061	0,088
0,062	
$\bar{x} = 0,049$	$\bar{x} = 0,078$

Reihe von Wiederfindungsversuchen ohne und mit Zusatz von Progesteron-bis-(dansylhydrazon). Ohne Zusatz der Progesteronverbindung ist die Streuung der Werte größer und die Wiederfindung beträgt nur 49%. Bei den mit Zusatz der Progesteronverbindung durchgeführten Wiederfindungsversuchen wurde dagegen eine Wiederfindung von 78% erzielt.

Präzision

Der Gehalt von Sammelplasma an freiem Ätiocholanolon wurde achtmal bestimmt. Als Mittel wurde eine Konzentration von 0,35 µg/100 ml gefunden. Die Standardabweichung betrug $s = 0,04$ µg/100 ml, der Variationskoeffizient $V = 11,4\%$.

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde nach KAISER (9) aus der 3s-Grenze der Streuung der Leerwerte berechnet; sie lag bei 0,006 µg in einer Probe.

Ätiocholanolonkonzentration des Plasmas gesunder Personen

Der Gehalt des Plasmas an freiem Ätiocholanolon wurde mit der angegebenen Methode bei 5 weiblichen und 12 männlichen gesunden Versuchspersonen bestimmt (Tab. 4). Die Werte lagen im Bereich von 0,09 bis 0,41 µg/100 ml mit einem Mittelwert von 0,25 µg/100 ml.

Tab. 4
Freies Ätiocholanolon im Plasma von Normalpersonen

Alter (Jahre)	Geschlecht	freies Ätiocholanolon (µg/100 ml)
17	♀	0,15
30	♀	0,29
32	♀	0,28
32	♀	0,20
55	♀	0,16
17	♂	0,11
18	♂	0,27
24	♂	0,33
24	♂	0,12
27	♂	0,16
27	♂	0,41
29	♂	0,09
30	♂	0,32
30	♂	0,34
31	♂	0,38
32	♂	0,40
37	♂	0,30
		$\bar{x} = 0,25$
		$s = \pm 0,10$

Diskussion

Im Gegensatz zu den konjugierten 17-Oxosteroiden Androsteron, Dehydroepiandrosteron und Ätiocholanolon kommt das freie, nicht konjugierte Ätiocholanolon in einer viel geringeren Konzentration im Plasma vor. Zur Diagnose des sog. Ätiocholanolonsfiebers ist aber gerade die quantitative Bestimmung des freien Ätiocholanolons von Wichtigkeit. Wegen der geringen Konzentration dieses Steroids im Plasma sollte eine Bestimmungsmethode besonders empfindlich sein. Bei der Reaktion von Oxosteroiden mit Dansylhydrazin entstehen die entsprechenden Dansylhydrazone, die man durch Dünnschichtchromatographie reinigen kann und die sich infolge ihrer starken Fluoreszenz besonders gut zur Bestimmung kleinster Mengen von Oxosteroiden eignen. Die Empfindlichkeit der fluorometrischen Bestimmung ist mehr als 30mal so groß wie bei photometrischen Methoden (7). Bei unserer Methode geschieht die Extraktion des Plasmas und die Entfernung der Lipide in der allgemein üblichen Weise. Durch eine 1. Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxid wird eine Vorreinigung des Ätiocholanolons erreicht. Der Verdampfungsrückstand des Eluates wird acetyliert und dann mit Dansylhydrazin umgesetzt. Das gebildete Acetylätiocholanolon-dansylhydrazon trennt man durch eine 2. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel ab und mißt seine Fluoreszenz nach dem Eluieren des Kieselgels. Die fluorometrische Messung erfolgt in Tetrachloräthan anstelle von Chloroform, da dieses Lösungsmittel infolge seines hohen Siedepunktes (146°) kaum verdunstet und das Volumen der Meßlösung konstant bleibt. Die von uns bei 17 Personen ermittelten Werte liegen im Bereich von 0,09 bis 0,41 µg/100 ml. GANDY und PETERSON (3) fanden mit einer Doppelisotopenverdünnungsmethode Normalwerte zwischen 0,01 und 0,27 µg/100 ml und die Normalwerte von KLOCKE und THIJSEN (4), bestimmt mit einer gaschromatographischen Methode, lagen zwischen 0,08 und 0,17 µg/100 ml. Mit der 2,4-Dinitrophenylhydra-

zin-Methode (6, 7) wurden jedoch höhere Normalwerte gefunden, die zwischen 0,5 und 1,2 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ lagen.

Der Vorteil der von uns beschriebenen Methode liegt darin, daß sie sich ohne Gaschromatograph und auch ohne Verwendung radioaktiv markierter Verbindungen ausführen läßt. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,006 μg ,

so daß sich die Bestimmung auch in 5 ml Plasma durchführen lassen müßte. Wir haben zunächst mit 10 ml Plasma gearbeitet, um bei der Bestimmung des freien Ätiocholanolons im Plasma gesunder Versuchspersonen auch die kleinsten Konzentrationen sicher erfassen zu können.

Literatur

1. SEGALOFF, A., C. BOWERS, D. GORDON, J. SCHLOSSER und P. MURISON, *Cancer (Philadelphia)* 10, 1116 (1957). — 2. KAPPAS, A., L. HELLMAN, D. FUKUSHIMA und T. GALLAGHER, *J. Clin. Endocr. (Springfield)* 17, 451 (1957). — 3. GANDY, H. M. und R. E. PETERSON, *J. Clin. Endocr. (Springfield)* 28, 949 (1968). — 4. KLOKKE, A. H. und J. H. H. THIJSEN, *Clin. chim. Acta (Amster-*

dam) 20, 167 (1968). — 5. FEHÉR, T. und L. HALMY, *Europ. J. Steroids* 2, 443 (1967). — 6. COHN, G. L., P. K. BONDY und C. CASTIGLIONE, *J. Clin. Invest.* 40, 400 (1961). — 7. TREIBER, L., W. RINDT und G. W. OERTEL, *diese Z.* 5, 102 (1967). — 8. GRAEF, V., *diese Z.* 8, 320 (1970). — 9. KAISER, H., *Z. analyt. Chem.* 209, 1 (1965).

Dr. Volkmar Graef
6300 Gießen
Friedrichstr. 24